

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

# **ВОДОРОСТІ В БІОЕНЕРГЕТИЦІ ТА ІНШИХ ГАЛУЗЯХ ПРОМИСЛОВОСТІ ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ**

*Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського  
як навчальний посібник для студентів,  
які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»,  
освітньою програмою «Біотехнології»*

Київ  
КПІ ім. Ігоря Сікорського  
2020

Водорості в біоенергетиці та інших галузях промисловості: Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», освітньої програми «Біотехнології» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: Н.Б.Голуб, І.І.Левтун – Електронні текстові дані (1 файл: 0,2 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 59с.

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського (протокол № 6 від 31.01.2020 р.)  
за поданням Вченої ради Факультету біотехнології і біотехніки (протокол №4 від 25.11.2019 р.)*

Електронне мережеве навчальне видання

## **ВОДОРОСТІ В БІОЕНЕРГЕТИЦІ ТА ІНШИХ ГАЛУЗЯХ ПРОМИСЛОВОСТІ**

Укладачі: *Голуб Наталія Борисівна, докт. техн. наук. доц.,  
Левтун Ігор Ігорович, канд. техн. наук*

Відповідальний *Кузьмінський Є.В., д.х.н., проф.*

редактор

Рецензент *Поліщук Валентина Юріївна, к.т.н, доцент. кафедри  
промислової біотехнології КПІ ім. Ігоря Сікорського*

В лабораторному практикумі наведено теоретичні матеріали щодо впливу біогенних елементів на біохімічні процеси, які відбуваються в мікроводоростях. Обширний теоретичний матеріал стосується ліпідів різних класів, що містяться у водоростях та невадено їх біологічну роль. Лабораторні роботи, представлені в практикумі, призначені для ознайомлення студентів з основами принципами культивування мікроводоростей, виділення та аналізу цільових продуктів.

Лабораторний практикум «Водорості в біоенергетиці та інших галузях промисловості» розроблено для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Загальні вимоги до підготовки до лабораторної роботи, її оформлення та захисту.....	7
Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.....	8
Лабораторна робота № 1. Культивування мікроводоростей на різних середовищах.....	10
Лабораторна робота №2. Вплив факторів середовища (освітлення, склад поживного середовища) на приріст біомаси водоростей.....	19
Лабораторна робота №3. Виділення ліпідів з мікроводоростей.....	27
Лабораторна робота №4. Аналіз ліпідної фракції.....	38
Лабораторна робота №5. Культивування мікроводоростей за використання топочних газів.....	47
Лабораторна робота №6. Зміна кількісного і якісного складу ліпідів водоростей під впливом факторів оточуючого середовища.....	53
Використана література.....	57

## ВСТУП

Відколи людство зіткнулося зі стрімким скороченням запасів викопних палив та негативними наслідками для навколишнього середовища їх використання, актуальним стало виробництво джерел енергії з відновлювальної сировини, насамперед первинної біомаси: лісів, сільськогосподарських технічних та харчових культур тощо. Такі біопалива, відомі як біопалива першого покоління, конкурують, в першу чергу, за орні землі, а виробництво їх залежить від погодних умов. Тому, розробка біопалив другого та третього поколінь, для виробництва яких не використовуються землі сільськогосподарського призначення, є актуальною проблемою сьогодення. Одним з видів такого біопалива є біопаливо з мікроводоростей, вирощування яких можливо реалізовувати як у відкритих системах (ставках), так і у закритих системах – фотобіореакторах, які розташовуються на землях непридатних до сільського господарства.

У порівнянні з традиційними олійними культурами, використання мікроводоростей для виробництва біопалив має ряд переваг, представлених можливістю керування якісним та кількісним складом цільових продуктів внаслідок направленої зміни метаболізму шляхом варіювання складу поживного середовища та параметрів процесу культивування. Окрім енергетичної цінності, мікроводорості являють джерело біологічно активних речовин (вітамінів, ферментів, факторів росту тощо), реалізація яких зменшує вартість одержаного пального. Також, перевагою мікроводоростей є їх здатність до росту на різних субстратах, і тому можливо культивування за використання газових викидів промислових підприємств, що зменшує антропогенне навантаження на довкілля.

У методичних вказівках наведено змістовна теоретична частина, оскільки матеріал, що викладається, відноситься до новітніх досліджень у галузі використання водоростей у енергетичних, харчових, сільськогосподарських та фармацевтичних цілях і не міститься у підручниках

за цією тематикою. Оскільки курс призначений для магістрів, то лабораторні роботи являють собою дослідження, внаслідок виконання якого студент повинен проаналізувати одержані результати та на основі теоретичних знань зробити висновки щодо біохімічних процесів, які впливають на розвиток мікроводоростей, та зміну їх метаболізму під дією факторів оточуючого середовища. Контрольні питання, що наведені до лабораторних робіт стосуються як лекційного матеріалу, так і лабораторної роботи.

*Метою проведення лабораторних робіт є надання студентам навичок проведення експерименту за заданою інструкцією та відповідним завданням, роботи з лабораторним обладнанням, реактивами. Студент повинен вміти інтерпретувати одержані результати та робити висновки щодо можливості зміни метаболізму у мікроводоростей за рахунок факторів оточуючого середовища, а також одержання корисних речовин та біопалива з заданими властивостями.*

## **Загальні вимоги до підготовки до лабораторної роботи, її оформлення та захисту**

При підготовці до лабораторної роботи з відповідної теми необхідно вивчити теоретичну частину, що стосується даної роботи.

Перед початком лабораторної роботи при співбесіді з викладачем студент зобов'язаний:

- Представити для обговорення план роботи, який детально з виділенням окремих етапів складений у відповідності з методикою роботи і зафіксовано в робочому журналі;

- Обґрунтувати всі розрахунки і відповідні перерахунки з урахуванням кількостей речовин і об'ємів розчинів, необхідних для напрацювання продукту, щоб можна було використовувати його в подальших методиках;

- Пояснити хімізм процесів і написати реакції, що лежать в основі цих процесів.

У звіті з лабораторної роботи фіксуються всі записи, що стосуються проміжних і кінцевих результатів аналізу (наприклад, дані про вихід продукту до сушіння, після сушіння тощо). При захисті лабораторної роботи студент викладає не тільки суть даного методу аналізу і констатує кінцевий результат експерименту, але також дає вичерпні відповіді на поставлені питання.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АЛК –  $\alpha$ -ліноленова кислота

АРК – арахідонова кислота

ДГДГ – дігалактозилдіацил гліцерин

ДГК – докозагексаєнова кислота

ДГКХ – 1,2-деацилгліцерил-3-О-карбокси-(гідроксиметил)-холін

ДГТА – 1,2-деацилгліцерил-3-О-2'-(гідроксиметил) -(N,N,N-триметил)- $\beta$ -аланін

ДГТС – 1,2-деацилгліцерил-3-О'-4-(N,N,N-триметил)-гомосерин ЖК – жирні кислоти

ДФГ – дифосфатидилгліцерин

ЕПК – ейкозопентаєнова кислота

ЖК – жирна кислота

МГДГ – моногалактозилдиацил гліцерин

МЕЖК – метилові ефіри жирних кислот

МПС – мікропроцесорна система

НАД – никотинамід аденін динуклеотид

НВЖК – ненасичені вищі жирні кислоти

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

РЦ – реакційні центри

ССК – світлосорбційні комплекси

СХДГ – сульфохиновозилдиацил глицерол

СХМГ – сульфохиновозилмоногалактозил гліцерин

ТАГ – триацилгліцерид

ФАД – флавінадениндинуклеотид

ФГ – фосфатидилгліцерин

ФГЕГ – фосфатидил-О-[N-(2-гідроксіетил)гліцин]

ФЕ – фосфатидилетаноламін

ФІ – фосфатидилінозитол

ФС – фото система

ФСХ – фосфотидилсульфохолін

ФХ – фосфатидилхолін



## Лабораторна робота № 1

### Культивування мікроводоростей на різних середовищах

*Мета: дослідити вплив якісного та кількісного складу стандартних живильних середовищ на процес культивування та приріст біомаси мікроводоростей Chlorella vulgaris*

Водоростям, як і вищим рослинам, необхідно три основні компоненти для росту та розвитку: сонячне світло, оксид карбону (IV) і вода. Як і рослини вони використовують фотосинтез для перетворення сонячної енергії на енергію хімічних зв'язків і запасання поживних речовин.

Частка Карбону в сухій біомасі водоростей складає понад 50%. Тобто, для утворення 1 кг біомаси водоростей необхідно понад 1,8 кг оксиду карбону (IV). Як альтернативне балонному і дешеве джерело цього газу для культивування водоростей можливо використовувати газові викиди, що утворюються при перебігу промислових процесів, згоряння викопних палив, а також ферментаційних процесів. Чистий CO<sub>2</sub> у лабораторній роботі за відсутності балонного одержують при проведенні спиртового бродіння або за використання біогазу з лабораторних метантенків. В останньому випадку відбувається з'ягачення біогазу метаном. Ферментаційний процес є одним з найбільш придатних для культивування водоростей, при цьому диоксид карбону можна використовувати без додаткового очищення, що зменшує витрати на виробництво кінцевих продуктів.

До поживних елементів, вміст яких є обов'язковим у середовищі для культивування і необхідним для росту мікроводоростей, зокрема виду *Chlorella*, належать N, P, Mg, S, K, Fe, Ca, Mn, Zn і Cu. Натомість немає даних щодо ролі і необхідності таких елементів як B, Mo, Na, Co, Sr [1].

## *Нітроген*

Ріст усіх організмів залежить від доступності мінеральних поживних речовин, з яких одним з найважливіших є Нітроген, що необхідний у значних кількостях, як основний компонент білкових молекул, хлорофілу, азотистих основ, що входять до складу нуклеїнових кислот та молекул, що забезпечують запасання та зберігання енергії. У перерахунку на суху масу клітин кількість Нітрогену становить 7 – 10%.

Більшість фотосинтетичних водоростей можуть рости, використовуючи неорганічні джерела Нітрогену, такі як іони нітрату або амонію. При чому амонійний нітроген споживається першочергово, тоді як нітрат часто не утилізується поки у середовищі присутні амонійні солі [2]. Додавання амонію до живильного середовища водоростевих культур призводить до різкого і повного інгібування асиміляції нітратів. Це пояснюється тим, що  $\text{NH}_4^+$  є кінцевим продуктом відновлення нітрату і інгібує процес за типом зворотного зв'язку.  $\text{NH}_4^+$  переводиться у органічні форми, а його асиміляція пов'язана з втратами внутрішньоклітинних запасів вуглеводнів. Першою сполукою, що синтезується при асиміляції амонійного нітрогену є глутамінова кислота, попередником якої є  $\alpha$ -глутарова кислота, а каталіз здійснюється глутамін дегідрогеназою. Однак багато водоростей чутливі до  $\text{NH}_4^+$  і їх ріст уповільнюється за концентрації, що перевищують 1 ммоль/л.

Асиміляція Нітрогену тісно пов'язана з концентрацією іонів водню у середовищі, так як при поглинанні нітрогену змінюється значення рН. Коли у якості основного джерела Нітрогену використовується амоній, рН середовища може швидко знижуватись і досягати значення 3,0. Зміна значень рН може бути причиною уповільнення росту, що спостерігається для деяких водоростей при зростанні концентрації амонію у середовищі, а надалі і зростанні внутрішньоклітинного рівня рН внаслідок поглинання слабодисоціюючих молекул гідроксиду амонію. Споживання нітрат-іонів веде до зростання рН [2].

## ***Фосфор***

Фосфати відіграють дві ключові ролі в метаболізмі мікробіот. По-перше, вони слугують структурними елементами ряду біологічних компонентів, наприклад, сахарофосфатний остов нуклеїнових кислот. Інша роль пов'язана з накопиченням та переносом енергії. Більшість видів мікробіот мають сталість клітинного вмісту Фосфору, що становить 1% сухої маси [2]. Потреби мікроорганізмів у фосфорі змінюються в залежності від виду. При визначенні оптимальних концентрацій фосфатів для діатомових та зелених мікробіот у лабораторних умовах було встановлено, що концентрація нижче 50 мкг/л фосфору є лімітуючою, при вмісті фосфору понад 20 мг/л спостерігається ефект інгібування росту, а оптимальною є концентрація у межах 0,1 – 2 мг/л [3].

Включення ортофосфату до клітин мікробіот є енергозалежним процесом, який забезпечується енергією завдяки одному з двох шляхів – фотосинтезу або диханню. Ортофосфат переважно включається до метаболізму клітин через реалізацію одного з трьох шляхів: 1) фотофосфорилування; 2) субстратного фосфорилування; або 3) окиснювального фосфорилування. На поглинання фосфатів впливають і інші фактори, такі як рН і концентрація іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  або деяких важких металів у середовищі.

За умов високого вмісту у середовищі, неорганічний фосфат акумулюється у мікробіотах у гранулах у вигляді поліфосфатних кислот, що метаболізуються за умов фосфорного голодування. При фосфорному голодуванні лімітуючою стадією клітинного циклу є  $G_2$  (премітотична) фаза, у якій закінчується «приготування» клітини до мітотичного поділу [4].

## ***Сульфур***

Подібно до Фосфору, Сульфур також є життєво необхідним елементом для клітин живих організмів, адже входить до складу деяких важливих амінокислот (метіоніну, цистеїну), вітамінів та сульфоліпідів. Потреби у

Сульфурі забезпечуються, в основному, за допомогою введення у поживне середовище неорганічного сульфату. Деякі водорості (*Chlorella*, *Euglena*) можуть споживати органічний сульфур, що входить до складу сірковмісних амінокислот. Надходження сульфату до клітини відбувається шляхом активного транспорту.

### ***Натрій і Калій***

Кількість Натрію є суттєвим фактором лише для ціанобактерій. Також вважається, що Натрій необхідний азотфіксуючим водоростям для перетворення молекулярного азоту на іон амонію.

Вміст у середовищі Калію важливий для всіх водоростей. В умовах калійного дефіциту ріст і фотосинтез уповільнюються, водночас прискорюються дихальні процеси. Повернення до нормального стану таких клітин досягається додаванням сполук Калію або Рубідію. Цей елемент виступає кофактором для декількох ферментів і включається до білкового синтезу і осморегуляції [1]. Згідно даних досліджень з мікроводоростями *Chlorella sorokiniana* оптимальна концентрація йонів калію у середовищі для росту біомаси знаходиться у межах 0,5 ммоль/л – 0,1 моль/л [2].

### ***Кальцій***

Кількість Кальцію, що необхідна для росту водоростей, є наразі предметом обговорення. Його фізіологічна роль повністю не з'ясована. Кальцій може відігравати роль у підтримці цитоплазматичних мембран. Він приймає участь в утворенні скелету деяких водоростей і може відкладатися всередині або на поверхні клітинних стінок у вигляді кальцитів або арагонітів. Для зелених водоростей його додають у невеликих кількостях.

### ***Магній***

Магній, займаючи центральне положення у молекулі хлорофілу, має велике значення для всіх фотосинтетичних організмів, у тому числі й

водоростей. Інші функції Магнію полягають у агрегації рибосом у функціональні одиниці і формуванні структури молекули каталази. Дефіцит Магнію, наприклад, у зелених водоростей призводить до порушення поділу клітин, що є причиною їх ненормально великих розмірів.

### **Ферум**

Ферум є одним з основних елементів у метаболізмі, що забезпечує функцію цитохромів, відіграє важливу роль у асиміляції Нітрогену, як функціональний елемент фередоксину і впливає на синтез фікоціаніну та хлорофілу.

Дискусійним питанням є те, у якому вигляді цей елемент має бути присутнім у середовищі, адже наразі немає згоди у питанні кращої доступності для водоростей елементарної, колоїдної або розчинної форми заліза. На сьогодні Ферум найчастіше вводиться у середовище у вигляді хелатних комплексів, для яких комплексоутворюючим елементом є етилендіамінтетраацетат (FeEDTA). Відоме також використання цитратних комплексів заліза, де лимонна кислота наряду з комплексоутворюючими властивостями проявляє буферну дію та є відновлюючим агентом [2].

### **Матеріали та реактиви**

Колби на 1 л, стаканчики, скляні палички, піпетки, пробірки на 50 мл, вата, марля.

### **Устаткування**

Термостат, аналітичні ваги, мікроскоп, камера Горяєва.

Камера Горяєва - це прилад призначений для підрахунку кількості клітин у заданому об'ємі рідини. Зовні вона являє собою прозорий паралелепіпед (предметне скло), з борознами і нанесеною мікроскопічною сіткою. Розміри малих поділок клітин сітки складають 0,05 мм, а великих – 0,2 мм. При цьому

сітка нанесена на ділянку скла, що розташована на 0,1 мм нижче, ніж дві сусідні ділянки. Ці ділянки слугують для притирання покривного скла. У результаті об'єм рідини над квадратом, утвореним малими діленнями сітки Горяєва, складає 0,004 мікролітра.

При роботі з камерою її робочі поверхні повинні бути чистими і сухими. Під час підрахунку клітин суспензії неприпустимо наявність пухирців повітря на сітці камери, оскільки це заважає точності підрахунку.

Підрахунок клітин у суспензії в камері Горяєва в малому квадраті проводився за рівнянням:

$$X = (a \cdot 4000 \cdot y) / b, \text{ кл/мкл}, \quad (1)$$

де  $x$  - шукана кількість клітин у суспензії в 1 мм<sup>3</sup>;  $a$  - сума клітин у суспензії, підрахованих у певному об'ємі камери;  $b$  - кількість підрахованих малих квадратів;  $y$  - розведення суспензії.

#### Склад поживних середовищ для культивування

Таблиця 1- Склад живильного середовища Тамія для культивування мікроводоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO <sub>3</sub>	5,0
2	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,5
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
4	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,003
5	ЕДТА	0,003
6	<b>Розчин мікроелементів</b>	<b>1 мл</b>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,36
	MnCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,81
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,222
	MoO <sub>3</sub>	0,018
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,023
7	Агар-агар (для густої) не використовуємо	20
8	Вода дистильована	

Таблиця 2- Склад живильного середовища Громова №6 для культивування мікроводоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO <sub>3</sub>	1,0
2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
4	NaHCO <sub>3</sub>	0,2
5	CaCl <sub>2</sub>	0,15
6	<b>Розчин мікроелементів</b> NaBO <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> ЕДТА (Трилон Б)	1 мл 2,63 1,81 0,222 1,0 0,02 0,079 9,3 10,0
7	Вода дистильована	

Таблиця 3- Склад живильного середовища модифікованого №2 для культивування мікроводоростей

№	Речовина	Концентрація, мг/л
1	KNO <sub>3</sub>	810
2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250
3	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	480
5	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	17,5
6	<b>Розчин мікроелементів</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O Цитрат Fe	1 мл 2,5 0,125 1,0 0,03 0,1 4,0
7	Вода дистильована	

Таблиця 4- Склад живильного середовища модифікованого №3 для культивування мікроводоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO <sub>3</sub>	1,0
2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,5
3	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
4	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
5	ЕДТА	0,01
6	<b>Розчин мікроелементів</b>	<b>1 мл</b>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,4
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,0
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,0
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,05
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,1
7	Вода дистильована	

### Хід роботи

1. Приготувати живильні середовища (ЖС) заданого якісного та кількісного складу (див. табл. 1 - 4) для культивування культури мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. ЖС приготувати у кількості 1 л кожного. З цією метою солі по чергово розчинити у окремих стаканах з невеликою кількістю дистильованої води (не більше 10 мл) та послідовно додавати отримані розчини у колбу місткістю 1 л.
2. Розчин мікроелементів об'ємом 50 мл приготувати в окремій колбі за вищезгаданою схемою і додати 1 мл приготованого розчину у колби, з основними компонентами середовища для культивування. Після внесення всіх необхідних компонентів, довести об'єм живильного розчину до 1 л шляхом додавання дистильованої води.
3. З кожного досліджуваного середовища за допомогою мірної піпетки відібрати по 30 мл розчину (у трьох повторностях) і внести до пробірок на 50 мл. Таким чином, отримують по 3 пробірки кожного з чотирьох середовищ (всього 12 пробірок). До кожного середовища додати 10 мл культури мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.



4. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Кількість клітин у малому квадраті камери Горяєва обчислюється за рівнянням (без розведення):

$$X = \frac{a \cdot 4000}{c}, \text{ кл./мкл} \quad (2)$$

де X – шукана кількість клітин у суспензії в 1 мкл;

a – сума клітин суспензії, підрахована у певному об'ємі камери;

c - кількість підрахованих малих квадратів.

Вивести середнє значення та записати до таблиці (операцію повторювати щодоби протягом 10 діб)

5.Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30<sup>0</sup>С та постійній освітлюваності. Вимірювання приросту біомаси за допомогою камери Горяєва проводити щодоби.

6. Починаючи з 6 доби з одної з 3 пробірок для кожного середовища, відбирати по 5 мл культуральної рідини і ввести по 5 мл свіжого живільного середовища. Розрахувати приріст біомаси протягом 6 діб.

7. Розрахунок питомої швидкості росту культури визначається за рівнянням:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}, \text{ доба}^{-1} \quad (3)$$

Де  $\mu$  - питома швидкість росту культури,  $N_0$  – кількість клітин на початку культивування,  $N_t$  – кількість клітин на даний час,  $t$  - час.

Середній час генерації клітин визначається за рівнянням:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}, \text{ доби} \quad (4)$$

## **Завдання**

Спостереження записати до таблиці. Розрахувати швидкість приросту культури та час її подвоєння. Зробити висновки, щодо якісного та кількісного складу культурального середовища та приросту біомаси. Визначити оптимальне середовище для культивування *Chlorella vulgaris*.

*Література [1 – 4]*

## **Питання для контролю**

1. Яка роль феруму та купруму для розвитку та розмноженню мікроводоростей?
2. Проведіть порівняльну характеристику складу жирних кислот у водоростей та олійних рослин.
3. Які елементи живлення необхідні для культивування мікроводоростей і чому ?
4. Яка роль магнію та калію для розвитку та розмноженню мікроводоростей впливає температура на приріст біомаси ?
5. Як впливає зміна форми джерел живлення на приріст біомаси ?

## **Лабораторна робота №2**

### **Вплив факторів середовища (освітлення, склад поживного середовища) на приріст біомаси водоростей**

*Мета: дослідити вплив якісного та кількісного складу поживного середовища та режиму освітлення на процес культивування та приріст біомаси мікроводоростей Chlorella vulgaris*

**Світло.** Зміна інтенсивності освітлення при культивуванні водоростей призводить до змін біохімічного складу клітин, що пов'язано зі змінами ультраструктур, біофізичних та фізіологічних властивостей спрямованих на урегулювання процесів фотосинтезу та росту клітин. Звичайною реакцією на зменшення інтенсивності або кількості освітлення є збільшення кількості хлорофілу *a* та інших світлочутливих пігментів. З іншого боку, при зростанні інтенсивності освітлення хлорофіл *a* та інші пігменти, що прямо задіяні у фотосинтезі зменшують активність, у той час як вторинні пігменти (зеаксантин,  $\beta$ -каротин, астаксантин), що слугують як фотопротекторні агенти, активуються.

Клітинний вміст у ліпідах ненасичених вищих жирних кислот (НВЖК), включно з ейкозопентаєною кислотою (ЕПК), обернено залежить від інтенсивності світла при вирощуванні. Позитивним модулятором загального накопичення ліпідів є знижена інтенсивність світла. Недостатність світла при вирощуванні біомаси клітин мікроводорості виду *Nannochloropsis* сприяє збільшенню кількості полярних ліпідів, що формують клітинну мембрану та мембрани хлоропластів - фосфо- та гліколіпіди, які характеризуються більшими ніж за звичайних умов пропорціями вмісту ЕПК, тоді як насичені ВЖК типу 16:0 і C16:1 $\omega$ -7 переважають при зростанні інтенсивності світла. Оскільки НВЖК значною мірою присутні у мембранах тилакоїдів, підвищена їх продуктивність при низькій кількості світла супроводжує зростання площі тилакоїдних мембран у клітині [2]. При надто високій інтенсивності освітлення часом спостерігається збільшення НВЖК, що вірогідно пов'язано із процесом зростання ступеню ненасиченості кислот за відповідних умов, медіатором якого є кисень [5]. Якщо вплив інтенсивності освітлення на процес росту клітин розглядати з урахуванням вмісту основних поживних речовин, виявляється, що висока інтенсивність освітлення при достатньому вмісті нітрогену у поживному середовищі, є позитивним фактором впливу на ріст культури і вміст ліпідів у ній, у той час як при недостатці нітрогену

надмірне освітлення призводить до пошкодження (руйнування) клітин водоростей [5].

**Температура.** Оптимальною для вирощування *Chlorella vulgaris*, є температура 30°C. Максимальний приріст біомаси, що відповідає 0,5 діб<sup>-1</sup>, відбувається за температури 32,5° С і при рН у межах 6,31 – 6,84 [ 6].

Вплив температури на біохімічні процеси робить її одним з найважливіших зовнішніх факторів, що впливають на біохімічний склад клітин водоростей. Однак, за використання газових викидів і СО<sub>2</sub> як джерело Карбону, потрібно враховувати вплив температурного фактора як на споживання поживних речовин, так і на розчинність газів. В роботах [6, 9] вивчено вплив температурного фактора на кількісний і якісний склад ліпідів. Зменшення температури середовища нижче оптимального рівня призводить до збільшення ступеню ненасиченості ліпідів мембранних систем. Так, вміст ЕПК у *Chlorella* за температури 28°C є нижчим ніж за температури 15° – 20°C за підтримання сталості інших умов. Підвищення стабільності і текучості клітинних мембран, особливо тилакоїдних, забезпечує захист фотосинтетичного механізму від фотоінгібування і зниженої температури. Температура, знаходячись на фізіологічно толерантному рівні, здійснює більший вплив на відносний склад ВЖК (ступінь насиченості ланцюгів) у різних класах ліпідів ніж на загальний вміст ліпідів у клітинах. Відомо, що зниження температури нижче оптимального рівня, призводить до зростання активності ферментного синтезу, як адаптивного механізму для підтримки сталого рівня дихання та фотосинтезу. Вплив температури на накопичення ліпідів є також видоспецифічним; так вміст ліпідів у деяких зелених водоростей, наприклад, *Chlorella sorokiniana*, при низькій температурі не підвищується, у той час як для *Chlorella ellipsoidea* спостерігається значний приріст вмісту неполярних ліпідів у біомасі [2].

Температура також впливає на кількість Карбону і Нітрогену, що необхідно клітинам, і на загальний розмір клітини. Оптимальна температура вирощування може бути причиною невеликого розміру клітин, а зменшення

або збільшення температури відносно оптимального рівня призводить до збільшення об'єму клітин. Тобто, за температурних умов відмінних від оптимальних, потребується більше поживних речовин для підтримки того ж рівня приросту клітин

**Недостача Нітрогену.** Основний лімітуючий фактор росту клітин – Нітроген, як один з основних елементів протеїнів, нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, обов'язково повинен надходити до клітин з мінеральними речовинами. Недостача Нітрогену значно уповільнює ріст біомаси культури, водночас з цим спостерігається збільшення вмісту ліпідів і жирних кислот у біомасі. У випадку зниження кількості Нітрогену у клітині нижче порогового значення, фотосинтез все ж продовжується, хоч і на зниженому рівні. За таких умов відбувається перенаправлення потоків Карбону, фіксованого у фотосинтезі, від напрямку синтезу протеїнів до переважаючих напрямків синтезу ліпідів або вуглеводів. Це зумовлено тим, що ферменти синтезу ліпідів менше піддаються катаболізму у порівнянні з ферментами білкового синтезу. Згідно іншій гіпотезі приріст кількості ліпідів за стресових умов вмісту нітрогену у культуральному середовищі розраховується згідно залежності: синтез – споживання, адже за стресових умов призупиняється використання клітинами ліпідів у енергетичних цілях.

На відміну від полярних ліпідів, що утворюються у клітинах з достатнім вмістом Нітрогену, при азотній недостатці домінантними стають триацилгліцерольні нейтральні форми [2].

**Недостача Фосфору.** Деякі ознаки нестачі Фосфору у поживному середовищі подібні до тих, що спостерігаються при недостатці Нітрогену. Відбувається зниження вмісту хлорофілу *a*, у той час, як кількість вуглеводів зростає у еу- та прокаріотичних клітинах. Відомо, що нестача фосфору призводить до накопичення  $\beta$ -каротину в клітинах *Dunaliella* і астаксантину у *Haematococcus*, однак не так помітно, як у випадку дефіциту Нітрогену [2, 5].

Під час фосфорного голодування клітин водоростей спостерігається накопичення ними значних кількостей ліпідів, у той час як вміст білків, хлорофілу та нуклеїнових кислот зменшується.

**Сульфур.** За надлишку сполук сульфуру (сульфіду, сульфіту та сульфату натрію) пригнічується швидкість фотосинтезу. Пояснити це можливо тим, що збільшення швидкості циклічного фосфорилування призводить до створення великого пулу фосфорильованих інтермедіатів циклу Кальвіна і сприяє більш інтенсивній роботі білків хлоропластів. Як відомо, циклічне фосфорилування є більш резистентним до дії несприятливих умов середовища, а сполуки сульфуру мають стресову дію. Таку дію можна пояснити імовірним одночасним впливом іонів натрію та сульфуру в різній ступені окиснення на водоокиснюючий комплекс фотосистеми II. При цьому не спостерігається прямої пропорціональності між концентрацією хлорофілу та інтенсивністю фотосинтезу [7].

**Недостача Калію.** В умовах недостачі Калію у середовищі, швидкість росту і фотосинтезу спадає, однак прискорюються дихальні процеси [2]. Підвищення концентрації калію у живильному середовищі негативно впливає на приріст біомаси водоростей [8].

**Недостача Феруму.** Дефіцит Феруму індукує різні біохімічні зміни. З одного боку, *c*-фікоціанін і хлорофіл *a* за даних умов піддаються деградації. З іншого боку, відбувається накопичення специфічного білку *isiA* (*iron-stress-induced*), що, зв'язуючись з ФС I, утворює комплекс у формі кільця з 18 білкових молекул *isiA* навколо тримера ФС I. Такий комплекс було знайдено у ціанобактерій, у середовищі культивування яких була недостача Феруму. Вважається, що збільшення інтенсивності ФС I досягається завдяки збільшенню гнучкості світлопоглинаючої системи в умовах зменшення ролі фікобілісом.

**Манган.** Даний мікроелемент необхідний для функціонування деяких ферментів фотосинтезу, а також ключового ферменту синтезу ліпідів ацетил-СоА-карбоксилази. За оптимального рівня вмісту він сприяє синтезу ліпідів.

### **Солоність.**

Багато мікрободоростей здатні до накопичення невеликих молекул, як осморегуляторних речовин у відповідь на збільшення солоності навколишнього середовища або осмотичного тиску. З числа таких речовин у водоростей найвагомішими є поліспирти, до яких відносяться гліцерол, манітол, галактітол, сорбітол та ін.

Зростання солоності може спричинити незначне зростання загального вмісту ліпідів, що спостерігається для культур *Monodus subterraneus* і *Dunaliella spp.* Відносний вміст ЕПК щодо загальних кислот за таких умов зменшується.

Найбільш оптимальними умовами для накопичення ліпідів є умови концентрації солей у середовищі на рівні близько 12% (за температури 14,5°C) [5]. При цьому за зазначених умов більший рівень накопичення мають насичені низьковуглецеві кислоти, а при відхиленні цього значення зростає відносний рівень ненасичених довголанцюгових кислот.

**pH.** Оптимальне значення pH для росту *Chlorella* знаходиться у межах 6,31 – 6,84. Екстремальне зростання pH значно уповільнює клітинний цикл *Chlorella*, лімітуючою стадією при цьому є вивільнення автоспор після поділу клітинних ядер.

Зміщення pH у сильнолужну зону сприяє зміні відносного вмісту різних класів ліпідів. Так, загальна кількість ліпідів у клітинах при pH > 11 зменшується, однак, змінюються класи клітинних ліпідів і жирних кислот (ЖК). При значному зменшенні кількості структурних мембранних ліпідів за даних стресових умов у кілька разів підвищується вміст запасних триацилгліцеролів (ТАГ). Паралельно відбувається зростання відносної кількості C16:0 та C18:1 ЖК у складі всіх трьох класів ліпідів та зменшення кількості ненасичених кислот [6].

### **Матеріали та реактиви**

Колби на 1 л, стаканчики, скляні палички, піпетки, пробірки на 50 мл, вата, марля, Сульфід натрію, сульфат натрію, нітрат натрію, концентрована сульфатна кислота

### Устаткування

Термостат, аналітичні ваги, мікроскоп, камера Горяєва, іонometr

### Дослід 1

### Хід роботи

Таблиця 5 - Вихідні дані для проведення експерименту

Середовище	pH	№ пробірки	Додана речовина	Концентрація, г/л
Середовище Тамія		1	Контроль	0
		2	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	2 г/л
		3	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1 г/л
Середовище Громова		1	Контроль	0
		2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 г/л
		3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 г/л
Середовище модифіковане №2		1	Контроль	0
		2	NaNO <sub>3</sub>	2,5 г/л
		3	NaNO <sub>3</sub>	1,25 г/л
Середовище модифіковане №3		1	Контроль	0
		2	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 г/л
		3	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 г/л

1. У пробірку на 50 мл додати 30 мл середовища, що одержані в попередній лабораторній роботі, та 10 мл суспензії культури мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. Дослідження проводити у трьох повторностях.
2. До пробірок згідно таблиці 5 додати речовини у кількості, що наведена.
3. За допомогою іонometру виміряти pH та записати до таблиці. Значення pH вимірювати щодоби.
4. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Кількість клітин у малому квадраті камери Горяєва обчислюється за формулою (2) (без



розведення). Вивести середнє значення та записати до таблиці (операцію повторювати щодоби протягом 8 діб)

5. Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30<sup>0</sup>С та постійній освітлюваності.

## Дослід 2

1. У пробірку на 50 мл додати 30 мл середовища, що одержані в лабораторній роботі №1, та 10 мл суспензії культури мікроводоростей *Chlorella vulgaris*
2. До пробірок згідно таблиці 5 додати речовини у кількості, що наведена.
3. За допомогою іонометру виміряти рН та записати до таблиці. Значення рН вимірювати щодоби.
4. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Значення вносити до таблиці.
5. Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30<sup>0</sup>С та освітлюваності 12х12- 5 діб, 8х8 – 5 діб, 4х4 – 5 діб
6. Починаючи з 5 доби з пробірок для кожного середовища, відбирати по 5 мл культуральної рідини і вводити по 5 мл свіжого поживного середовища. Розрахувати приріст біомаси при різній освітлюваності за формулами, що наведені в лабораторній роботі №1.

## Завдання

Значення рН, концентрації клітин для усіх дослідів занести до таблиці. Розрахувати приріст клітин та час подвоєння клітин для кожного середовища та кожного параметра освітлюваності. Зробити висновки щодо впливу сполук сульфуру та нітрогену і режиму освітлюваності на приріст біомаси водоростей. Визначити оптимальні умови вирощування.

*Література [2,7-10]*

## Питання для контролю

1. Вплив режиму освітлюваності на приріст біомаси водоростей.
2. Поясніть, на які процеси у мікрowodоростях впливає освітлюваність.
3. Як освітлюваність впливає на біосинтез ліпідів та їх якісний склад?
4. Вплив сполук нітрогену на біосинтез жирних кислот та їх якісний склад.
5. Вплив сполук сульфуру на біосинтез та якісний склад жирних кислот у мікрowodоростей.
6. Вплив температури на якісний склад жирних кислот мікрowodоростей.

## Лабораторна робота №3 Виділення ліпідів з мікрowodоростей

*Мета: провести екстракцію ліпідів з біомаси зелених мікрowodоростей та визначити їх вміст в перерахунку на одиницю сухої біомаси.*

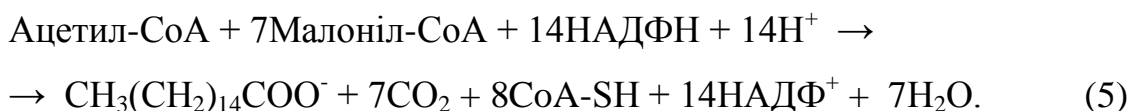
Мікрowodорості містять ліпіди і ЖК, як мембранні компоненти, запасні речовини, метаболіти і джерела енергії. До складу цитоплазматичної мембрани входять переважно лише фосфоліпіди, у той час, як гліколіпіди формують мембрану внутрішньоклітинних органел. Єдиним фосфоліпідом, що входить до складу цих органел є фосфатидна кислота. Енергетичну і запасну функції виконують нейтральні ТАГ, що знаходяться у цитоплазмі у вигляді крапель. Відомо, що деякі види водоростей здатні накопичувати велику кількість ліпідів (понад 30%) у залежності від середовища культивування. Наприклад, *Chlorella* sp., *Botryococcus braunii* та *Dunaliella salina*, що відносяться до відділу зелених водоростей, класу вольвоксових, за нормальних умов культивування мають наступний компонентний склад: 30 – 50% білки, 20 – 40% вуглеводи, 8 – 15% ліпіди. Однак, за несприятливих умов ці види можуть акумулювати до 80% АГ, 80% вуглеводів і до 40%

гліцеролу у перерахунку на суху вагу [2]. Тобто, фактори зовнішнього середовища, такі як світло, температура, вміст поживних речовин і солоність впливають не лише на фотосинтез і продуктивність біомаси клітин, а й на шляхи і активність клітинного метаболізму, призводячи до змін якісного і кількісного складу клітин.

Особливості біосинтезу ліпідів у водоростей, на відміну від вищих рослин, полягають у тому, що клітини перших є недиференційованими, а отже кожна клітина біомаси має однаковий потенціал синтезу і накопичення необхідних речовин під впливом зовнішніх умов і поживного середовища. Ліпіди вищих рослин накопичуються головним чином у репродуктивних органах (насінні або фруктах). Окрім того, для клітин водоростей властивим є накопичення у значних кількостях довголанцюгових поліненасичених ЖК, таких як ейкозапентаєнова ( $C_{20}:5\omega3$ ), докозагексаєнова ( $C_{22}:6\omega3$ ) і арахідонова ( $C_{20}:4\omega6$ ). Рослини ж здатні синтезувати ЖК з довжиною ланцюга більше за  $C_{18}$  у досить обмеженій кількості, а деякі поліненасичені кислоти ( $C_{16}:4\delta-7$ ,  $C_{18}:3\delta-5$ ,  $C_{18}:4\delta-5$ ) взагалі для них не властиві.

Синтез жирних кислот у водоростей головним чином відбувається у хлоропластах. Загальна схема біосинтезу показана на рис. 1. ЖК використовуються як попередники в утворенні структурних елементів хлоропластів, клітинних мембран так само і нейтральних запасних ліпідів, переважно триацилгліцеридів, що можуть накопичуватись за несприятливих умов росту відповідних мікроорганізмів.

На початку шляху синтезу ацетил-СоА включається як субстрат ферменту ацетил-СоА карбоксилази (реакція 1). Новоутворений малоніл-СоА активується шляхом заміни коферменту А на ацилпереносний білок (АПБ). Далі малоніл-АПБ приймає участь у ряді реакцій конденсації з кожним оборотом циклу, при цьому довжина ланцюга збільшується на два атоми карбону. В цілому, сумарна реакція синтезу ЖК є загальною як для вищих рослин, так і для водоростей і у випадку пальмітинової кислоти  $C_{16}$  виглядає наступним чином:



Джерелом ацетил-CoA для даного процесу є мітохондріальний пул, що формується переважно у ході процесів окиснення різних органічних речовин. Відомо, що мітохондріальна мембрана не проникна для молекул ацетил-CoA. Перенесення ацетил-CoA через мембрану відбувається за допомогою спеціального механізму, за яким внутрішній мітохондріальний ацетил-CoA спочатку реагує з оксалоацетатом, утворюючи цитрат:

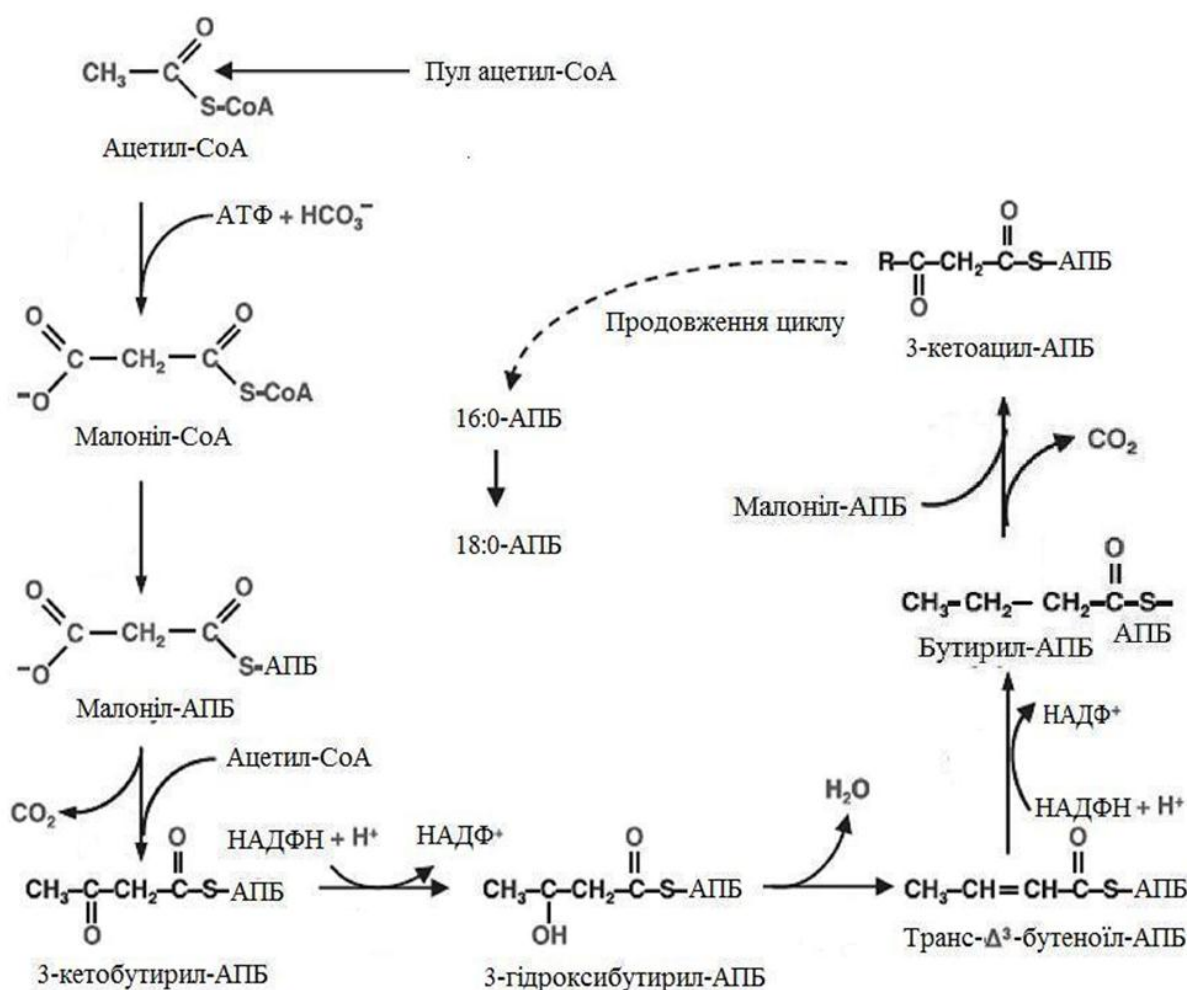
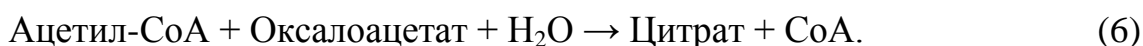
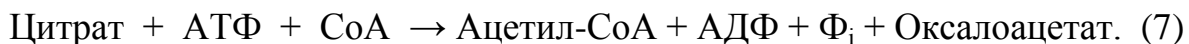


Рис. 1. Шлях синтезу жирних кислот у хлоропластах [11].

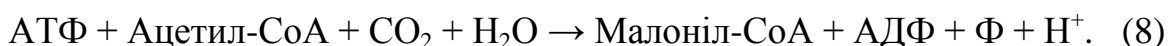
Цитрат, що утворився, переноситься через внутрішню мембрану мітохондрій з матриксу в цитозоль за допомогою спеціальної трикарбоксилат-транспортуючої системи. Далі цитрат реагує з CoA і АТФ в

цитозолі, утворюючи цитозольний ацетил-СоА. Ця реакція каталізується АТФ-цитратліазою:



Утворений у ході реакції оксалоацетат, не може надійти назад всередину мітохондрії. Він відновлюється під дією цитозольної малатдегідрогенази до малату, який за допомогою дикарбоксилат-транспортної системи повертається в мітохондріальний матрикс, де знову окислюється до оксалоацетату, завершуючи цикл.

Утворений у цитозолі ацетил-СоА піддається карбоксилюванню, внаслідок чого утворюється малоніл-СоА – безпосередній попередник 14 з 16 вуглецевих атомів в молекулі пальмітинової кислоти. Цю необоротну реакцію каталізує ацетил-СоА-карбоксилаза [12]:



Ацетил-СоА-карбоксилаза – регуляторний фермент. Реакція, що каталізується цим ферментом, є лімітуючим етапом, що визначає швидкість всього процесу біосинтезу жирних кислот. Для перебігу стадії транскарбоксилювання необхідна присутність  $\text{Mn}^{2+}$  зв'язаного з білком.

Головним позитивним модулятором ацетил-СоА-карбоксилази є цитрат, що ініціює перехід ферменту у високоактивний ниткоподібний полімер. Як тільки вміст цитрату в мітохондріях збільшується, що спостерігається при високій швидкості утворення мітохондріального ацетил-СоА і АТФ, цитрат виходить з мітохондрій і виступає одночасно в ролі попередника цитозольного ацетил-СоА і алостеричного активатора ацетил-СоА-карбоксилази [12].

Утворена кислота у виді ацил-АПБ або сполучається з гліцерол-3-фосфатом і далі включається в ланцюжок утворення пластидних ліпідів, або гідролізується і утворює ліпіди цитоплазматичної мембрани.

Біосинтез тригліцеридів та фосфогліцеридів представлений на рис. 2:

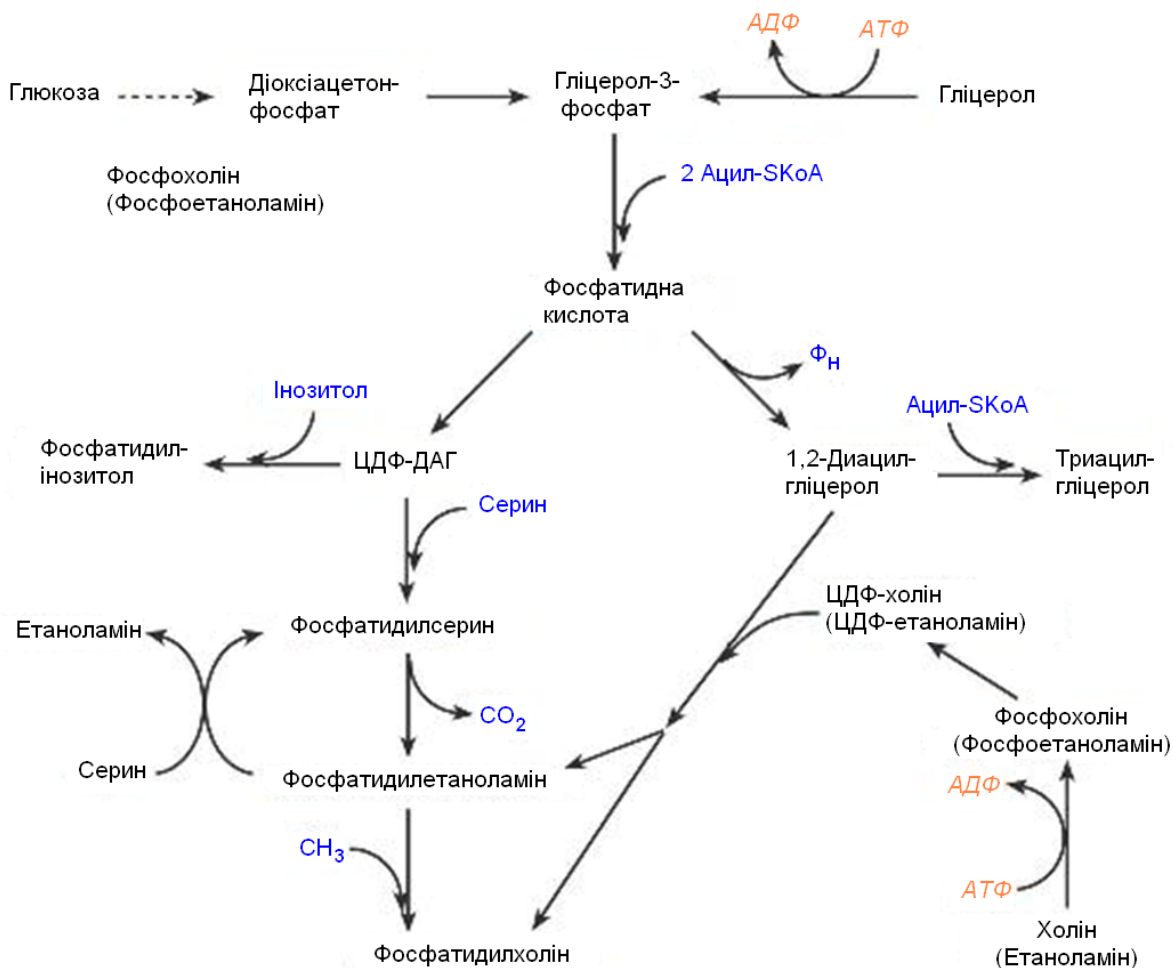


Рис. 2. Загальна схема реакцій синтезу триацилгліцеролів і фосфоліпідів (ЦДФ-ДАГ – цитидиндифосфат-діацилгліцерол, ЦДФ-холін – цитидиндифосфат-холін, ЦДФ-етаноламін – цитидиндифосфат-етаноламін) [2].

Початкові реакції синтезу триацилгліцеролів і фосфоліпідів подібні і відбуваються за наявності гліцеролу і жирних кислот. У реакціях біосинтезу можна виділити наступні стадії:

1. Утворення гліцерол-3-фосфату через діоксиацетонфосфат з глюкози або при фосфорилуванні вільного гліцеролу.

2. Біосинтез фосфатидної кислоти - за наявності гліцерол-3-фосфату і жирних кислот. При зв'язуванні гліцерол-3-фосфату з жирними кислотами синтезується фосфатидна кислота. Далі фосфатидна кислота може перетворюватися двома шляхами - в цитидиндифосфат-діацилгліцерол або дефосфорильованого до 1,2-діацилгліцерол (далі -1,2-ДАГ).

3. Синтез триацилгліцеролів - іде з 1,2-ДАГ після дефосфорилювання фосфатидної кислоти. Утворений 1,2-ДАГ ацилюється до триацилгліцеролу (далі – ТАГ).

4. Синтез фосфоліпідів. Зараз розглядаються два шляхи синтезу фосфоліпідів.

По одному шляху 1,2-ДАГ не перетворюється на ТАГ, а зв'язується з етаноламіном з утворенням фосфатидилетаноламіну, або з холіном - утворюється фосфатидилхолін.

Іншим шляхом, ЦДФ-ДАГ зв'язується або з інозитолом, або з серином з утворенням відповідно фосфатидилінозиту або фосфатидилсерину.

При декарбоксилюванні фосфатидилсерину, утворюється фосфатидилетаноламін, який може перетворитися, у свою чергу, в фосфатидилхолін.

Синтезований будь-яким способом фосфатидилетаноламін також здатний взаємодіяти з серином і утворювати фосфатидилсерин.

Таким чином, кожен з основних фосфоліпідів - фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламін, фосфатидилхолін - здатний надходити з різних джерел, що сприяє підтримці необхідного балансу.

Прісноводні водорості найчастіше містять ті ж самі жирні кислоти, що й вищі рослини, проте в інших співвідношеннях. Більшість жирних кислот у цих водоростей зазвичай є нерозгалуженими з парним числом атомів вуглецю — від 14 до 18. Для прісноводних водоростей характерні вищий вміст  $C_{16}$  жирних кислот і нижчий —  $C_{18}$  кислот (особливо  $\alpha$ -ліноленової), ніж у листі вищих рослин. Морські ж види переважно відзначаються набагато ширшим спектром жирних кислот, ніж прісноводні водорості. Вони містять велику кількість відмінних від  $\alpha$ -ліноленової кислоти полієнових жирних кислот [2].

Для екстракції ліпідів з біологічного матеріалу використовують систему, що включає неполярний і полярний розчинники. З клітин

водоростей ліпіди екстрагують з вологих клітин за методикою Блая і Дайера (Bligh & Dyer) [13].

Залежно від полярності розчинника ліпіди (а саме полярні фосфоліпіди) поводять себе неоднаково на межі розділу фаз органічна речовина – вода. Таким чином змінюється і ступінь екстракції. В табл. 6 наведено розчинники, які використовуються для екстракції.

Оскільки молекули фосфоліпідів мають амфіфільну природу, то їх полярні «голови» у неполярних або слабополярних розчинниках (гексан, діетиловий ефір) знаходяться у воді. Окрім того, у гексані навіть вуглеводневі «хвости» фосфоліпідів знаходяться не в органічній фазі, а у прилеглому шарі. У діетилового ефіру полярність вища (2,9), ніж у гексану, тому неполярні «хвости» фосфоліпідів знаходяться в органічній фазі, а полярна частина знаходиться або на межі розподілу двох фаз (що не гідратується), або у водній фазі (що гідратується). Розчинність бутанолу у воді найвища зі всіх досліджуваних розчинників, тому всі фосфоліпіди, незалежно від того, гідратуються вони або ні, переходять в органічну фазу.

Таблиця 6 – Розчинники для екстракції ліпідів [14]

Розчинник	Полярність	Густина, г/см <sup>3</sup>	Розчинність у воді, мас. %	Вміст ліпідів в екстракті, мг/100 мл
Гексан	0	0,6590	0,01	52,4
Діетиловий ефір	2,9	0,7135	7,5	84,88
Бутанол	3,9	0,8096	7,9	73,84
Хлороформ	4,3	1,4890	0,82	74,52
Хлороформ-етанол	4,84	-	-	169,12

У хлороформі всі види фосфоліпідів добре розчинні, тому велика частина їх міститься в органічній фазі, проте у водному шарі залишаються фосфоліпіди, що здатні до гідратації.



Методика, запропонована Блайом і Дайером може легко використовуватися для біоматеріалу, який містить відносно малу кількість ліпідів і великі пропорції води. Суміш хлороформу і метанолу дозволяє розчинити широкий спектр ліпідів. Ця система придатна для екстракції як полярних, так і неполярних ліпідів. Оптимальні умови для екстракції є тоді, коли суміш розводять водою, оскільки утворюється двофазна система. Нижній шар хлороформу містить ліпіди, верхній метанол-водний шар акумулює неліпідні компоненти. Зменшення кількості ліпідів у верхній фазі можна досягти використанням насиченого водного розчину солі, наприклад NaCl, замість дистильованої води [13].

Дана методика не передбачає гомогенізації клітин мікроводоростей, оскільки вони легко розпадаються при контакті з розчинниками для екстракції. Метод екстракції ліпідів неполярними розчинниками може застосовуватись як автономно, так і у поєднанні з виділенням олій на пресі. Після віджиму залишки біомаси промиваються циклогексаном. Ліпіди розчиняються в органічному розчиннику, а біомаса відфільтровується. Далі розчин розділяється шляхом дистиляції. Дана методика (холодний віджим і розчинення в гексані) дозволяє отримати вихід олій до 95% від загального вмісту [14].

**Обладнання:** центрифуга, аналітичні ваги, годинник

**Реактиви та матеріали:** хлороформ, метанол, дистильована вода, кристалічний хлорид натрію, пробірки для центрифугування, скляна воронка, скляні бюкси, фільтрувальний папір, гумові пробки, піпетки або шприци, колба на 100 мл, стакани на 100 мл

### **Хід роботи**

1. Необхідну кількість бюксів помити, висушити, пронумерувати та довести до сталої ваги (замість бюксів можна використовувати центрифужні

пробірки). Зважування проводити на аналітичних терезах. Відповідні значення занести до таблиць 7 та 8.

2. Приготувати суміш розчинників, що складається з 10 мл хлороформу та 20 мл метанолу.

3. Приготувати водний розчин NaCl:

Зважити 5 г сухого NaCl та внести наважку до мірної колби на 100 мл. Долити невелику порцію води та перемішати до повного розчинення наважки солі. Розчин довести до мітки дистильованою водою.

4. Суспензію мікроводоростей, що одержана в попередніх лабораторних роботах за оптимальних умов росту, піддають центрифугуванню при частоті обертання 2500 об/хв. Процес проводять періодами по 10-15 хв до переважного осадження клітин біомаси, що контролюється візуально. Після повного осадження клітин обережно зливають рідину над осадом. За необхідності в цю саму пробірку додати наступну порцію суспензії клітин і повторювати центрифугування до отримання необхідної кількості біомаси.

5. Отриману біомасу з пробірки ретельно переносять до відповідного попередньо зваженого бюксу. Для повного перенесення можна використати невелику кількість води. Бюкси з вологою біомасою сушать у сушильній шафі за температури 105-115°C до сталої ваги. Зважування проводити на аналітичних терезах. Відповідні значення занести до таблиці 7 та розрахувати сухий залишок біомаси за рівнянням:

$$m_c = m_{b+c} - m_b \quad (9)$$

Пояснення позначень наведені в таблиці 7.

Таблиця 7- Дані для розрахунку сухої маси сировини для екстрагування

№ бюксу	Середовище, на якому зростала культура мікробіодоростей	Маса сухого порожнього бюксу, ( $m_0$ ), г	Маса бюксу з висушеною біомасою водоростей ( $m_{0+c}$ ), г	Сухий залишок сировини для екстрагування, ( $m_c$ ), г

6. Після останнього зважування біомаси клітин до бюксу додають 5 мл суміші розчинників. Бюкс закривають, енергійно струшують протягом 5 хв та дають відстоятися протягом не менш, ніж 12 годин. За цей час суха біомаса, що залишилась на стінках бюксу протягом сушіння, під дією суміші розчинників осяде.

7. Після відстоювання вміст бюксу перелити до пробірки для центрифугування. Кілька разів обполоскати бюкс порціями суміші розчинників по 2 мл за раз. Змив зливати до пробірки, де міститься перша порція екстракту. Вміст пробірки енергійно струсити. Екстракт центрифугувати періодами по 10-15 хв за частоти обертання 2000 об/хв до повного осадження біомаси, яке контролюється візуально.

8. Після центрифугування рідку фракцію перелити до нового чистого бюксу. До залишку біомаси додати ще 2 мл суміші розчинників та знову центрифугувати. Супернатант перелити в пробірку до першої порції надосадової рідини. Залишкову біомасу зберегти для подальшого використання.

9. До бюксу з освітленим екстрактом додати 3 мл водного розчину NaCl, закрити його, енергійно струсити та дати відстоятися до зникнення помутніння у нижній, темно-зеленій фракції. Відбулося вилучення водорозчинних компонентів з хлороформно-метанольного екстракту та їх перехід до водного розчину NaCl.

10. Після цього обережно шприцом вилучити з бюксу водну фракцію.

11. Бюкси з очищеним екстрактом ліпідів поставити до сушильної шафи. Висушування проводити за температурного режиму 105-115°C до сталої ваги. Зважування проводити на аналітичних терезах. Результати занести до таблиці 8.

Масу сухого залишку ліпідів розраховуємо зарівнянням:

$$m_{\text{л}} = m_{\text{б+л}} - m_{\text{б}} \quad (10)$$

Пояснення до позначень наведені в таблиці 8.

Таблиця 8- Дані для розрахунку сухої маси ліпідів

№ бюксу	Примітка	Маса сухого порожнього бюксу, ( $m_{\text{б}}$ ), г	Маса бюксу з сухим залишком ліпідів, ( $m_{\text{б+л}}$ ), г	Маса сухого залишку ліпідів, ( $m_{\text{л}}$ ), г

12. Розрахункові дані щодо сухого залишку клітинного матеріалу та отриманої маси ліпідів внести до таблиці 9 та розрахувати відсотковий вміст ліпідів у сухому матеріалі зарівнянням:

$$\omega = (m_{\text{с}}/m_{\text{л}}) \cdot 100\% \quad (11)$$

Таблиця 9 - Дані для розрахунку та результат розрахунку відносного вмісту ліпідів у сировині

Середовище на якому культивувалась біомаса водоростей	Сухий залишок сировини для екстрагування, ( $m_{\text{с}}$ ), г	Маса сухого залишку ліпідів, ( $m_{\text{л}}$ ), г	Вміст ліпідів у сухому залишку, $\omega$ , %

## **Завдання**

Розрахувати вміст ліпідів у сухій біомасі мікроводоростей та зробити висновки щодо зміни кількісного складу ліпідів в залежності від умов культивування ( вмісту поживних речовин та режиму освітлюваності). Визначити оптимальні умови культивування для одержання максимальної кількості ліпідної фракції.

*Література [2,10,14]*

## **Питання для контролю**

1. Вплив сполук сульфуру на кількісний вміст ліпідів.
2. Вплив сполук нітрогену на кількісний вміст ліпідів.
3. Вплив елементів живлення на кількісний вміст ліпідів.
4. Вплив режиму освітлюваності на кількісний вміст ліпідів.
5. Методи вилучення ліпідів з мікроводоростей.
6. Методи відділення мікроводоростей від культуральної рідини.
7. Біосинтез жирних кислот та фосфоліпідів.

## **Лабораторна робота №4**

### **Аналіз ліпідної фракції**

*Мета – проаналізувати склад ліпідної фракції за допомогою одновимірної та двовимірної тонкошарової хроматографії*

Природа залишків жирних кислот, що входять до складу гліцероліпідів мікроводоростей, є надзвичайно важливою як для виконання ліпідами їх функцій, так і для комерційного застосування водоростей. З точки зору жирнокислотного складу, водорості є об'єктами з унікальним біотехнологічним потенціалом. Якщо до складу ліпідів вищих рослин

входить переважно невелика кількість жирних кислот (до 7-8), то мікрородості часто мають набагато різноманітніший набір насичених і ненасичених вищих карбонових кислот з довжиною ланцюга від 12 до 28 атомів Карбону [2].

В табл. 10 наведено склад жирних кислот рослинних олій та мікрородостей.

Таблиця 10 – Жирнокислотний склад (% сумарної кількості жирних кислот) соєвої і пальмової олій, а також водоростей [15]

Жирні кислоти	Соєва олія	Пальмова олія	Водорості
Каприлова (8:0)		9,7	
Капринова (10:0)		7,5	
Лауринова (12:0)		42,1	
Міристинова (14:0)		22,4	9,1
Пальмітинова (16:0)	14,69	18,2	36,6
Пальмітоолеїнова (16:1)			11,9
Маргарінова (17:0)			0,89
Стеаринова (18:0)			2,7
Олеїнова (18:1)	5,4		6,7
Лінолева (18:2)	26,8		7,4
Ліноленова (18:3)	44,4		22,3
Арахінова (20:0)	8,0		
Арахідонова (20:4)	0,35	0,14	0,65
Ейкозапентаєнова (20:5)			0,08
Бегенова (22:0)	0,33		
Насичені	20,77		49,29
Ненасичені	52,4	100,04	30,43

З насичених жирних кислот у складі водоростей переважає пальмітинова кислота, з ненасичених – пальмітоолеїнова (16:1) і ліноленова (18:3). Загальна ненасиченість жирних кислот ліпідів мікрowodоростей значно вища, ніж у пальмової олії, але поступається соєвій олії.

Європейський стандарт EN 14214 чітко обмежує вміст ліноленової кислоти, який має бути не більшим 12%. Крім того, в цьому стандарті зазначається, що кількість поліненасичених естерів з числом подвійних зв'язків  $\geq 4$  має бути не більше одного відсотка. Це пов'язано із нестійкістю таких сполук і легкістю їх окиснення [16].

Деякі мікрowodорості здатні запасати досить велику кількість ліпідів у формі триацилгліцеролів (до 57% сумарних ліпідів), які відкладаються в цитоплазмі у вигляді великих крапель [2, 15]. У здорових клітинах, що активно діляться, частка тригліцеридів у загальній кількості ліпідів зазвичай є низькою. Однак перехід водоростей у стаціонарну фазу росту чи вплив деяких стресових чинників може стимулювати накопичення тригліцеридів. Посилений синтез триацилгліцеролів та відкладання їх у запас вважається одним з елементів ранньої відповіді на ріст в умовах, коли кількість енергії, що надходить ззовні, перевищує можливості клітини утилізувати цю енергію шляхом росту й поділу клітини. При цьому кількість тригліцеридів може сягати до 80 % від загального вмісту ліпідів. Для прокаріотичних синьо-зелених водоростей не властиве запасання ліпідів у формі триацилгліцеролів; практично всі їх жирні кислоти входять до складу полярних ліпідів, які утворюють велику систему фотосинтетичних мембран.

Головною насиченою кислотою ліпідів мікрowodоростей у певних випадках може бути міристинова, проте в більшості випадків такою є пальмітинова кислота. Ліпідам водоростей здебільшого притаманний високий вміст ненасичених жирних кислот, які можуть мати від 1 до 6 (інколи до 8) подвійних зв'язків. При порівнянні з вищими рослинами увагу привертає наявність у водоростей тетраєнових  $C_{16}$  і  $C_{18}$  кислот.

Довголанцюгові жирні кислоти ( $C_{20}$  і більше) зустрічаються в основному в галотолерантних видах і переважно є високоненасиченими.

Окремі види чи порядки мікрободоростей накопичують такі незвичні сполуки, як бетаїнові ліпіди, хлоросульфоліпіди чи деякі інші сульфоліпіди, вуглеводні, частково деацильовані або, навпаки, додатково ацильовані похідні гліко- і фосфоліпідів. Певні мікроорганізми можуть містити глікозильовані похідні вищих полігідроксиспиртів чи полігідроксикарбонових кислот, вільні (неетерифіковані) жирні кислоти, вищі спирти, диацилгліцероли, сфінголіпіди, стероли й естери стеролів, естери воску, арсенвмісні ліпіди тощо. Під визначення ліпідів підпадають також хінони, токофероли та зелені пігменти водоростей – хлорофіли [15].

Більшість жирних кислот використовується водоростями для побудови мембран і синтезу ефірів. Наприклад, мембрани хлоропластів збагачені глікозилгліцеридами, тоді як плазматична та ендоплазматична мембрани збагачені фосфоліпідами. Жирні кислоти з непарним числом атомів вуглецю (наприклад, 15:0, 17:0, 17:2n-5) і розгалужені жирні кислоти (ізостеаринова та інші) можуть зустрічатися в окремих видах водоростей як мінорні компоненти [17].

Насичені та ненасичені жирні кислоти значно відрізняються за конфігурацією. У насичених кислотах вуглеводневий ланцюг може приймати безліч конформацій завдяки повній свободі обертання навколо кожного окремого зв'язку. Однак найбільш вірогідною є енергетично вигідніша витягнута форма. У ненасичених кислотах неможливе обертання навколо подвійних зв'язків, що обумовлює жорсткий перегин вуглеводневого ланцюга. Такі структурні властивості ланцюгів жирних кислот мають велике біологічне значення, оскільки відомо, що ненасичені жирні кислоти забезпечують високу плинність і вибірккову проникність мембранного бішару [17].

Якісний і кількісний склад жирних кислот еукаріотичних мікрободоростей є надзвичайно різноманітним. У еугленових водоростей



якісний склад залежить навіть від типу живлення. Культури, що фотосинтезують, містять жирні кислоти від  $C_{14}$  до  $C_{22}$  з переважанням  $C_{16}$  і  $C_{18}$  кислот. Червоні водорості багаті на ненасичені довголанцюгові жирні кислоти, головним чином  $C_{20}$  – ейкозапентаєнову та арахідонову. До типових жирних кислот діатомових та еустигматофітових водоростей відносяться міристинова, пальмітинова, пальмітоолеїнова та ейкозапентаєнова; при цьому вміст  $C_{18}$  кислот здебільшого є низьким. Зелені водорості здебільшого мають подібний до вищих рослин та олійних дріжджів жирнокислотний склад – з домінуванням  $C_{16}$  і  $C_{18}$  кислот, як насичених, так і ненасичених. Кілька видів містить багато ейкозапентаєнової кислоти.

Прісноводні водорості найчастіше містять ті ж самі жирні кислоти, що й вищі рослини, проте в інших співвідношеннях. Більшість жирних кислот у цих водоростей зазвичай є нерозгалуженими, з парним числом атомів вуглецю – від 14 до 18. Для прісноводних водоростей характерні вищий вміст  $C_{16}$  жирних кислот і нижчий  $C_{18}$  кислот (особливо  $\alpha$ -ліноленової), ніж у вищих рослинах. Морські ж види переважно відзначаються набагато ширшим спектром жирних кислот, ніж прісноводні водорості; помітною їх ознакою є велика кількість відмінних від  $\alpha$ -ліноленової кислоти полієнових жирних кислот.

Жирнокислотний склад ліпідів мікроводоростей може дуже змінюватись при варіюванні умов культивування. Так, зниження температури культивування, так само як і підвищення рівня освітленості, призводить до зростання частки ненасичених жирних кислот у хімічному складі водоростей. Ненасичені жирні кислоти мають меншу теплоту згорання, оскільки у них менша спорідненість до кисню (при зберіганні вони легше окиснюються). Натомість використання лише насичених жирних кислот підвищує температуру замерзання біодизелю, що ускладнює його використання за низьких температур.

Жирнокислотний склад ліпідів також залежить від їх таксономічного положення. Так, кількісно головною жирною кислотою прокаріотичних

синьозелених водоростей (ціанобактерій) є пальмітинова (16:0). Довжина ацильних ланцюгів у гліцероліпідах синьозелених водоростей не перевищує 18 атомів вуглецю. На основі жирнокислотного складу синьозелені водорості поділяють на 4 групи. Штами першої групи містять лише насичені та моноєнові жирні кислоти, а трьох інших – ще й полієнові: другої –  $\alpha$ -ліноленову (18:3n-3) і лінолеву (18:2n-6), третьої –  $\gamma$ -ліноленову (18:3n-6) і лінолеву, четвертої – стеаридонову (18:4n-3), обидва види ліноленової та лінолеву. *Chlorella vulgaris* містить полієнові жирні кислоти, які відносяться до другої групи.

Накопичення ліпідів у водоростей відбувається зазвичай у період стресу та при дефіциті поживних речовин. Вміст ліпідів і жирних кислот варіює у відповідності до умов культивування. У деяких випадках вміст ліпідів може збільшуватись внаслідок азотного голодування та інших стресів [2]. При цьому метаболізм змінюється в бік підвищення акумуляції нейтральних ліпідів у вигляді ТАГ, які не виконують жодних структурних функцій, а є формою запасання вуглецю та енергії. Згідно біохімічних досліджень вважається, що ацетил-СоА-карбоксилаза – біотинвмісний фермент, що каталізує ранні стадії синтезу жирних кислот і може приймати участь у контролі процесу накопичення ліпідів. Тому одним із способів підвищення олійності водоростей є збільшення активності цього ферменту методами генетичної інженерії [18].

Водорості містять від 2 до 40% ліпідів / жирних кислот від їх маси. Найбільша їх кількість знайдена у *Prymnesium parvum*, *Chlorella vulgaris* та *Scenedesmus dimorphus*, що дає можливість застосовувати їх для промислового виробництва біодизельного пального або біологічно активних речовин (БАР) (табл. 11).

Таблиця 11 – Хімічний склад водоростей, % від сухої маси [2]

Вид	Білки	Вуглеводи	Ліпіди	Нуклеїнові к-ти
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Вміст жирних кислот у межах одного і того ж виду може істотно відрізнятися у різних класів ліпідів. Запасні ліпіди, такі як триацилгліцероли, часто містять набагато менше ПНЖК, ніж полярні гліцероліпіди. З полярних ліпідів МГДГ звичайно має найвищий ступінь ненасиченості жирнокислотних залишків, а СХДГ – найменший. Вміст полярних ліпідів і триацилгліцеролів, порівняно з іншими ліпідними фракціями, практично у всіх мікроводоростей набагато вищий.

Якісний та кількісний аналіз ліпідів визначають за допомогою хроматографічних методів, зокрема методами рідинної та тонкошарової (ТШХ) хроматографії, які наразі вважаються найефективнішими і універсальними способами розділення інтактних сумішей ліпідів та їх ліпофільних фрагментів. Більш того, якщо в якості адсорбенту

використовується силікагель, оброблений нітратом срібла, то методом ТШХ можна розділяти ліпіди одного класу по числу подвійних зв'язків. Розділення ліпідів методом ТШХ проводять зазвичай на силікагелі, проте можна використовувати оксид алюмінію, іонообмінну целюлозу, сефедекс, целюлозу та ін. [19].

Хроматографічне дослідження проводять для полярних ліпідів, до яких відносяться фосфоліпіди. Фосфоліпіди – група похідних 1,2-диацилгліцерол-3-фосфату, що має назву фосфатидної кислоти. Похідні можуть утворюватись за рахунок приєднання до фосфатної групи аміноспиртів або полігідрокси сполук. Прикладами таких ліпідів є:

- фосфатидилхолін (ФХ, тривіальна назва лецитин);
- фосфатидилетаноламін (ФЕА, тривіальна назва цефалін);
- фосфатидилсерин (ФС);
- фосфатидилінозитол (ФІ);
- фосфатидилгліцерол (ФГ);
- дифосфатидилгліцерол (ДФГ, тривіальна назва кардіоліпін).

Одновимірною тонкошаровою хроматографією дає хороше розділення ліпідів, однак, для отримання більш достовірних даних розділення екстракту необхідно проводити у різних системах. Використовують системи на основі суміші хлороформ/метанол. Хлороформ вимиває гліколіпіди у верхню частину пластини. Для розкладу суміші гліколіпідів на компоненти, до носія додають ацетон.

Для проявлення пластин використовуються різні речовини – йод (проявлення ліпідів за рахунок зв'язування з ненасиченими ділянками ЖК), фосфомолібденова кислота (якісний реагент на фосфорну кислоту, також може з'єднуватись з іншими ліпідами, що мають велику кількість ненасичених зв'язків), а-нафтол (для специфічного визначення гліколіпідів), молібдат амонію (специфічне визначення фосфоліпідів) та ін.

**Матеріали і реактиви:** метанол, хлороформ, хроматографічні пластини, 5% розчин фосфомолібденової кислоти, ацетон, піпетки, колби, дистильована вода, 25% розчин гідроксиду амонію, оцтова кислота.

**Прилади:** сушільна шафа, устаткування для проведення хроматографії

### **Хід роботи**

1. У 100 мл колбі приготувати розчин хлороформ – метанол у співвідношенні 1:2 за об'ємом
2. Екстракти, що одержані в роботі 3, розчинити у суміші  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 об.) так, щоб отримати розчини однакової концентрації.
3. Активувати пластинки для хроматографії у сушільній шафі протягом 30 хв за температури  $115^\circ\text{C}$ .
4. Для проведення одновимірної хроматографії приготувати нейтральну систему складу хлороформ : метанол : вода (65:25:4 об.) у 100 мл колбі.
5. На пластинку нанести по три треки кожного зразка масою екстракту 50, 100 та 150 мкг у кожному.
6. Хроматографічну пластинку занурити у розчин хлороформ: метанол: вода і витримати 1 годину.
7. У 100 мл колбі приготувати лужний розчин складу  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/25\%\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (90:70:5,5:15 об.), який використовується для двовимірної хроматографії.
8. У 100 мл колбі приготувати кислий розчин складу  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$  (40:15:14:13:7,5 об.), який використовується для двовимірної хроматографії.
9. Спочатку провести розгонку за використання лужного розчину, для чого на хроматографічну пластинку нанести по три треки кожного зразка масою 50, 100 та 150 мкг у кожному. Занурену пластинку у лужний розчин витримати 1 год. і висушити в сушільній шафі при  $60^\circ\text{C}$ .

10. Провести хроматографію у кислому розчині в другому напрямі. Для чого пластинку занурити у кислий розчин і витримати 1 год, висушити у сушійльній шафі при 60<sup>0</sup>С.
11. Для проявлення хроматографічних пластин у обох випадках нанести на пластинку аерозоль 5% розчин фосфомолібденової кислоти (ФМК).
12. Пластинку прогріти при 120<sup>0</sup>С у сушійльній шафі до проявлення.

### **Завдання**

За використання літературних джерел провести ідентифікацію одержаних ліпідів. Отримані результати записати до протоколу.

*Література [2,15-20]*

### **Питання для контролю**

1. Які ліпідні фракції містяться у мікроводоростях?
2. Які жирні кислоти містяться у різних видах мікроводоростей?
3. Чим відрізняються жирні кислоти?
4. Принцип дії тонкошарової хроматографії.
5. Які Ви знаєте розчинники для ліпідів.
6. Хроматографічні методи, що застосовуються для визначення ліпідів та жирних кислот.
7. Методи ідентифікації хроматограм.

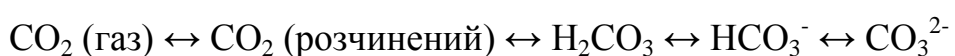
## **Лабораторна робота №5**

### **Культивування мікроводоростей за використання топочних газів**

*Мета: дослідити вплив топочних газів на процес культивування та приріст біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris**

Основним джерелом Карбону для мікроводоростей, як для фотосинтетичних організмів, є CO<sub>2</sub>. Однак, до біологічних циклів

включається не сам газ, а кислотний залишок відповідної кислоти, що утворюється при реакції з водою під час його розчинення. Розчинність вуглекислого газу у воді становить близько 0,88 об'єму на 1 об'єм розчинника. Масова ж концентрація розчиненого газу, як відомо з закону Генрі, залежить від його парціального тиску, тобто від концентрації. Оскільки CO<sub>2</sub> є кислотним оксидом, то у водному розчині частково відбувається хімічна реакція з утворенням вугільної кислоти і встановлюється рівновага між наступними станами розчиненого CO<sub>2</sub>:



Вміст CO<sub>2</sub> в атмосфері у середньому на сьогодні складає близько 0,046% за масою (0,032% за об'ємом). Цієї кількості абсолютно достатньо для росту біомаси мікроорганізмів при барботуванні суспензії, але вона відмінна від оптимальної, за якої спостерігається максимальний приріст біомаси. Згідно [21] при стандартній атмосферній концентрації CO<sub>2</sub> і температурі 30°C питома швидкість росту біомаси мікроводоростей становить близько половини максимальної і складає 0,128 діб<sup>-1</sup>. Цей показник зростає до значення 0,222 діб<sup>-1</sup> при збільшенні концентрації CO<sub>2</sub> у повітряній суміші до 6%. Різкі зміни концентрації CO<sub>2</sub> у воді гальмують або повністю зупиняють процес фотосинтезу [2].

Багато видів мікроводоростей добре ростуть при досить великих концентраціях вуглекислого газу. Так, *Chlorococcum littorale* зростає за концентрації у повітрі 60% CO<sub>2</sub>. Іншим толерантним видом є *Euglena gracilis*, у процесі росту якої концентрація CO<sub>2</sub> в повітрі складала 5-45%. Найвища продуктивність була при 5%. Проте при підвищенні концентрації CO<sub>2</sub> вище за 45% ріст культури пригнічувався. *Scenedesmus sp.* може зростати за умов 80% CO<sub>2</sub>, але найбільший приріст характерний для концентрацій 10-20%. *Cyanidium caldarium* і деякі інші представники *Cyanidium* можуть культивуватися за використання чистого вуглекислого газу.

Здатність до асиміляції CO<sub>2</sub> є найважливішим критерієм при селекції мікроводоростей. Для порівняння, насичення культурального середовища газоподібним джерелом Карбону у вигляді CO<sub>2</sub> показали ефективність його утилізації на рівні 96% ± 1%, тоді як додавання карбонатів дають 81% ± 11% ефективності споживання Карбону [22].

При достатньому забезпеченні елементами мінерального харчування подача CO<sub>2</sub> у воду збільшує приріст біомаси до 80%, час подвоєння скорочується в 1,5 – 2 рази. Згідно даних компанії „ПРОМБИОТЕХНИКА”, за добу отримується 500 мг сухої біомаси на 1 м<sup>2</sup> поверхні фотобіореактора, що в декілька разів вище, ніж при звичайному способі вирощування мікроводоростей [23].

Варто зазначити, що збільшення концентрації CO<sub>2</sub> у воді знижує вміст нітратів у мікроводоростей. Тобто, використання вуглекислого газу можна розглядати як ефективний інструмент управління процесом фотосинтезу та енергозбереження.

Потреба у поживних речовинах мікроводоростей, навіть серед представників одного виду, може варіювати досить широко, а тип живлення може змінюватись від облігатного автотрофного до облігатного гетеротрофного, що відбувається, наприклад, при зміні джерела Карбону або певних умов середовища. Тобто, звичайно, фотоавтотрофні організми можуть утилізувати як неорганічні так і органічні джерела Карбону. Подібна гнучкість споживання субстрату більш детально досліджувалась на представниках відділу зелених водоростей *Chlorophyceae* – *Scenedesmus* sp. та *Chlorella* sp., що досить важливі для масштабного виробництва біодизельного пального. Було встановлено [2], що ці водорості можуть варіювати між авто- і гетеротрофією тому, що вони здатні до використання CO<sub>2</sub> на світлі і певних форм органічного Карбону у темряві. Однак, широкому використанню цукрів у живленні водоростей перешкоджає обмеження їх проникності через клітинну стінку. Стимуляція росту мікроводоростей під дією цукрів спостерігається при зниженій освітленості



або у темряві. При інтенсивному освітленні не спостерігається додаткового приросту біомаси [2]. З іншого боку представники роду *Dunaliella* не здатні рости гетеротрофно, тобто використовуючи органічний Карбон як єдине його джерело. Так, відомо, що дані водорості не ростуть за відсутності освітлення на середовищі, що містить ацетат або глюкозу, як джерело карбону [2].

Зростання значення приросту біомаси у різних середовищах відбувається у наступній послідовності: автотрофне < гетеротрофне < міксотрофне.

Питання утилізації техногенної емісії промислових і енергетичних виробництв – одне з найбільш актуальних на сьогоднішній день. Запропоновано використання топочних газів як джерела карбону. Використання димових газів для подачі у біореактор можливо лише при повному очищенні його від токсичних газів (CO, оксиди азоту та сірки). Неповна очистка шляхом сушки димового газу призводить до утворення конденсату в подаючих трубопроводах у вигляді сірчаної кислоти, яка при надходженні у фотобіореактор призводить до загибелі мікроводоростей [22].

У роботі [4] описано вплив NO<sub>x</sub> і SO<sub>x</sub> з парціальним тиском 50 ppm (миллионная доля (ppm, от англ. *parts per million* — частей на миллион), та 10% CO<sub>2</sub> на ріст *Chlorella* sp. HA-1 при освітленості 380 мкмоль/(м<sup>2</sup> ·с) і температури 26°C. Не було помічено жодного негативного впливу SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> на розвиток водоростей, а високий вміст вуглекислого газу легко переносився даним організмом. Японські вчені виділили представників роду *Chlorella* з гарячих джерел, які показали найкращий приріст при температурі 42°C і концентрацією CO<sub>2</sub> 40%. *Monoraphidium minutum* давав на 20% кращий приріст клітин при дії димових газів зі швидкістю потоку 60 мл/хв і пропусканні тричі на добу, ніж зі швидкістю 15 мл/хв. при пропусканні 55 разів за добу [26].

Оскільки зазвичай димові гази мають температуру 120°C, проводиться скринінг термофільних або толерантних до високих температур мікроводоростей [18]. Термофільні водорості здатні розвиватися в межах 42-100°C. Перевагою таких організмів є зменшення витрат на охолодження

середовища. Крім того, термофіли можуть продукувати цінні вторинні метаболіти.

### Матеріали та реактиви

Колби на 1 л, стаканчики, скляні палички, піпетки, пробірки на 50 мл, вата, марля, 5 л колба, балон з CO<sub>2</sub>.

### Устаткування

Термостат, аналітичні ваги, мікроскоп, камера Горяєва, іонометр, прилад для спалювання та пропускання топочних газів, компресор.

Установка по дослідженню впливу димових газів на накопичення ліпідів складається з печі для спалювання твердого палива, холодильника для охолодження газу, 2-х каналного повітряного компресора, ватного фільтра для очищення повітря від твердих часток та ємності для мікроводоростей (рис. 3).

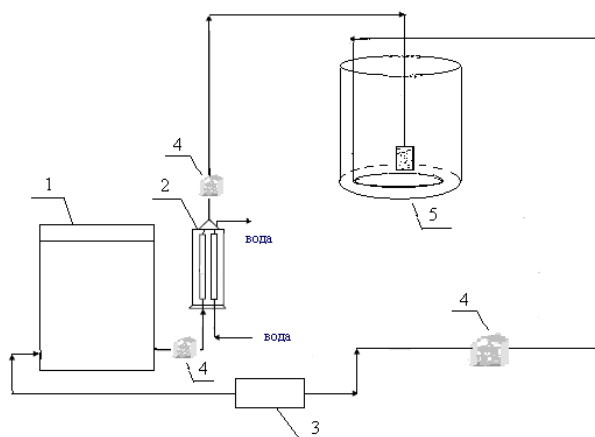


Рисунок 3 – Схема лабораторної установки для дослідження впливу димових газів на мікроводорості: 1 – піч для спалювання твердого палива; 2 – холодильник для охолодження газу; 3 – 2-х каналний повітряний компресор; 4 – ватні фільтри для очищення повітря і димових газів від твердих часток; 5 – ємність для мікроводоростей.

У піч 1 закладається розжарене тверде паливо (деревне або кам'яне вугілля, торф). Димові гази разом з повітрям проходять через холодильник 2. Далі гази поступають в ємність з мікроводоростями 5. Ватні фільтри 4 уловлюють пилоподібні забруднення повітря. За допомогою компресора 3

повітря подається у піч для підтримання горіння твердого палива, а також у ємність з мікроводоростями для аерування та перемішування.

### **Хід роботи**

1. Дослід проводити за використання поживного середовища Громова №6. Методику приготування поживного середовища Громова № 6 описано в лабораторній роботі №1.
2. В установку для пропускання топочних газів покласти вугілля та підпалити його. Газові викиди, що виходять з печі після очищення від твердих речовин та охолодження за використання водяного холодильника ввести в пробірку №5.
3. У п'ять пробірок на 50 мл додати 30 мл середовища Громова №6 та 10 мл суспензії культури мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.
4. Пробірки позначити: 1 – контроль - барботування CO<sub>2</sub> не проводиться, 2 – барботується CO<sub>2</sub> 2 хвилини на добу, 3 – 5 хвилин, 4 – по 2 хвилини двічі на добу, 5 – барботується топочними газами - 5 хвилин. Термін культивування 10 діб.
5. За допомогою іонометру вимірювати значення рН до барботування та після нього. Значення записати до таблиці.
6. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Кількість клітин у малому квадраті камери Горяєва обчислюється за рівнянням (2) (без розведення). Вивести середнє значення та записати до таблиці (операцію повторювати щодоби протягом 10 діб)
7. Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30<sup>0</sup>С та постійній освітлюваності.
8. Розрахувати питому швидкість росту культури та середній час генерації клітин за рівняннями (3) та (4).

## **Завдання**

Спостереження записати до таблиці. Розрахувати швидкість приросту культури та час її генерації. Зробити висновки, щодо впливу часу барботування та значення рН розчину на приріст біомаси водоростей. Визначити оптимальні умови барботування CO<sub>2</sub> для культивування *Chlorella vulgaris*. Порівняти приріст біомаси за використання CO<sub>2</sub>, одержаного з балону та топочних газів на приріст біомаси водоростей.

*Література [18-24]*

## **Питання для контролю**

1. Вплив джерел карбону на культивування мікроводоростей.
2. Провести порівняльну характеристику джерел карбону на приріст мікроводоростей.
3. Сумісний вплив CO<sub>2</sub> та освітлення на приріст біомаси водоростей.
4. Технологія введення джерел карбону в фото реактори різного типу.

## **Лабораторна робота №6**

### **Зміна кількісного і якісного складу ліпідів водоростей під впливом факторів оточуючого середовища**

*Мета: проаналізувати якісний та кількісний склад ліпідів в залежності від концентрації нітрогену в культурній рідині.*

Накопичення ліпідів відбувається, зазвичай, за умов навколишнього середовища, відмінних від оптимальних, як, наприклад, при дефіциті поживних речовин. Вміст ліпідів і ЖК змінюється у відповідності до умов культивування. У більшості випадків вміст ліпідів може збільшуватись внаслідок азотного голодування та умов недостачі інших поживних елементів. При цьому збільшується час, необхідний для завершення

клітинного циклу і акумуляція ліпідів може відбуватися за рахунок інгібування стадії циклу, на якій синтез ТГ відбувається швидше, ніж їх утилізація. Згідно досліджень *Cooksey* і *Guckert* [27], де як стресовий фактор досліджувалось збільшення кислотності середовища (pH), лімітуюча стадія клітинного циклу лежить у періоді між поділом ядра і вивільненням автоспор. При фосфатному голодуванні зупинка клітинного циклу відбувається раніше, а саме на G<sub>2</sub> фазі, що пояснюється обмеженістю пулу АТФ та інших фосфорвмісних сполук, і, таким чином, недостатністю енергетичних і будівельних (роль яких, наприклад, грають фосфоліпіди) ресурсів [4]. Нестача азоту суттєво впливає на формування пігментних систем, структур хлоропласта та його загальну активність. Концентрація азоту визначає кількість і активність рибулозо-дифосфаткарбоксилази.

В табл. 12 представлено вплив факторів середовища на накопичення ліпідів та якісний склад жирних кислот.

Таблиця 12- Вплив умов культивування на якісний склад жирних кислот водоростей [2].

Фактор впливу	Зміна складу жирних кислот
Нестача Нітрогену	Підвищення вмісту жирних кислот
Надлишок нітрогену	Зниження вмісту С <sub>22</sub> кислот
Підвищена інтенсивність освітлення	Підвищення вмісту жирних кислот
Низька температура	Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот
Mn <sup>2+</sup>	Підвищення вмісту жирних кислот
Підвищення концентрації CO <sub>2</sub>	Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот
Зниження співвідношення N : P	Підвищення вмісту жирних кислот
Дефіцит фосфату	Підвищення вмісту жирних кислот

**Обладнання:** центрифуга, аналітичні ваги, годинник.

**Реактиви та матеріали:** хлороформ, метанол, дистильована вода, кристалічний хлорид натрію, пробірки для центрифугування, скляна воронка,

скляні бюкси, фільтрувальний папір, гумові пробки, піпетки або шприци, колба на 100 мл, 500 мл, стакани на 100 мл, нітрат натрію.

### Хід роботи

1. Аліквоту біомаси (100 мл), вирощеної за стандартних умов на середовищі Беккера або іншому, перенести у 500 мл колби на модифіковане за нітрогеном середовище (N<sup>-</sup> - середовище позбавлено нітрат іонів, N<sup>+</sup> - концентрація за Нітрогеном 50 мг/л, N<sup>0</sup> – 200 мг/л – середовище Беккера). У разі використання іншого середовища зробити перерахунок на вміст Нітрогену у середовищі). До біомаси додати 200 мл модифікованого середовища. За використання середовища Беккера нітрати калію та натрію замінюють на еквівалентну кількість їх хлоридів. Регуляція вмісту нітрат іону проводиться шляхом внесення NaNO<sub>3</sub>. Попередньо провести розрахунок необхідної кількості NaNO<sub>3</sub> для забезпечення концентрації за нітрогеном 50 мг/л.
2. Культивування проводять протягом 20 діб, щодоби барботуя 5 хвилин CO<sub>2</sub>. Через 10 діб до колб додати 100 мл середовища Беккера.
3. Колби помістити у термостат при температурі 30<sup>0</sup>С і постійному освітленні.
4. Виділення клітин водоростей з культурального середовища проводять за використання центрифуги при 1500-2500 об/хв. як описано у роботі №3. Осад у пробірці висушити до постійної маси пробірки у сушильній шафі за температури 120<sup>0</sup>С. Концентрацію біомаси визначити зарівнянням:

$$C_B = \frac{(m_k - m_n) \cdot 1000}{V}, \text{ г/л,} \quad (12)$$

де  $m_k$  – маса пробірки з біомасою після висушування;  $m_n$  – маса пусотої, сухої центрифужної пробірки; 1000 – перерахунок на об'єм 1 л при відбиранні аліквоти об'ємом V мл. Результати записати до таблиці.

5. Виділення ліпідів проводять як описано в роботі №3 за методикою Блайя та Дайера. До вологої пасти клітин масою 15-20 мг, отриманої шляхом центрифугування суспензії, додати 2 мл суміші хлороформ:метанол (1:2), суміш струсити протягом 5 хв. та відстояти протягом 12 годин. Екстракт відфільтрувати. Залишок клітинного матеріалу знову екстрагувати 1 мл хлороформу, відфільтрувати і осад промити 2,5 мл хлороформу. До фільтрату додати воду для розділення фаз, нижню гідрофобну фазу перенести за допомогою шприца у попередньо зважений бюкс, випарити досуха під струменем азоту у водяній бані при 35-40 °С.

Бюкс зважити і за формулою 13 визначати вміст ліпідів у об'ємі суспензії. Розрахувати вміст ліпідів у біомасі у відсотках:

$$C = \frac{C_L \cdot 100}{C_B}, \%, \quad (13)$$

Кількість неочищених сумарних ліпідів визначати за допомогою аналітичних терезів.

6. У 100 мл колбі приготувати розчин хлороформ – метанол у співвідношенні 1:2 за об'ємом. Екстракти, що одержані в роботі, розчинити так, щоб отримати розчини однакової концентрації.

7. Провести хроматографічний аналіз, як описано у лабораторній роботі № 4.

### **Завдання**

Визначити вміст ліпідів у біомасі. Порівняти кількісні показники за використання різного вмісту сполук нітрогену у середовищі. Зробити висновки. За використання літературних джерел провести ідентифікацію одержаних хроматограм ліпідів. Отримані результати записати до протоколу. Проаналізувати зміну якісного складу ліпідів в залежності від складу середовища культивування. Зробити висновки.

Література [2,9]

### Питання для контролю

1. Вплив сполук нітрогену на кількісний вміст ліпідів.
2. Вплив концентрації сполук нітрогену на якісний вміст ліпідів.
3. Вплив складу поживних речовин на якісний вміст ліпідів у мікроводоростях
4. Якісний склад ліпідної фракції *Chlorella vulgaris* в контролі та при нестачі джерел нітрогену
5. Методи вилучення ліпідів з мікроводоростей.

### Використана література

1. Hooper J. Introduction to Algology: With a Catalogue of American Algæ / J. Hooper // Forgotten Books, 2018. – 34 pp.
2. Becker E. W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology / E. W. Becker – Cambridge University Press – 1994. – P. 295
3. Унутис В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микро-водорослей / В. В. Унутис // Отв. ред. А.Ф. Ноллендорф. — Рига: Зинатне, 1983. — 240 с.
4. Parpais J. Effect of phosphorus starvation on the cell cycle of the photosynthetic prokaryote *Prochlorococcus* spp. / J. Parpais, D. Marie, F. Partensky, P. Morin, D. Vaultot // Marine ecology progress series. – 1996. – Vol. 132. – pp. 265 – 274.
5. Hu Q. Chapter 5: Environmental effects on cell composition, pp. 83-93 / Richmond A. (ed.) // *Handbook of Microalgal Culture*. – Blackwell Science Ltd, Oxford OX2 0EL, UK. – 2004. – pp. 83 – 93.
6. Jinsoo Kim. Growth Kinetic Study of *Chlorella Vulgaris* / Jinsoo Kim, Joo-Youp Lee, Tim C. Keener // AIChE Annual Meeting. – 2009.– :P 6.



7. Голуб Н.Б., Ситнік О.І., Будика К.Е., Вплив сполук сульфуру на процеси фотосинтезу та дихання у *Chlorella vulgaris* // Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія «Хімія» 2012, №726 С.153-158
8. Голуб Н.Б., Бунча В.Ю. Вплив іонів лужних металів на приріст біомаси та накопичення ліпідів (метаболізм) у *Chlorella vulgaris*// Наукові вісті НТУУ «КПІ», 2012, № 3, С. 12-17.
9. Golub N. B., Levtun I. I., A Closer Look at Biodiesel Production, under edition of Luisa Rios / N.B. Golub, I.I. Levtun // Nova publishing, 2019, 317 pp.
10. Golub N. B., Levtun I. I., Influence of light energy wavelengths on cultivation of *Chlorella vulgaris* / N.B. Golub, I.I. Levtun // Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2016. – Вип 841. – С 138-144.
11. Gupta V.K. Biofuel and Biorefinery Technologies / V.K. Gupta, Tuohy, Maria G. // Springer. – 2019. – pp. 107.
12. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 2. / А. Ленинджер [Пер. с англ.] – М.: Мир, 1985. – 368 с., ил.
13. Bligh E.G. A rapid method for total lipid extraction and purification / E.G. Bligh, W.J. Dyer // Can.J.Biochem.Physiol -1959. – Vol. 37. – pp. 911-917.
14. Lewis T. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs / T. Lewis, P.D. Nichols, T.A. McMeekin // Journal of Microbiological Methods. – 2000. – Vol. 43. – pp. 107–116.
15. Chisti Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // Biotechnology Advances. – 2007. – Vol. 25 – pp. 294–306.

16. *prEN 14214:2002*, Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods [Текст] / European committee for standartisation. – 2002. – P. 13
17. *Басова М. М.* Жирнокислотный состав липидов некоторых видов микроводорослей / М.М. Басова // Альгология. – 2005, №4 – С. 415-436.
18. *Sheehan J.* A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-biodiesel from algae, Closeout Report / T. Dunahay, J. Benemann, P. Roessler. – National Renewable Energy Laboratory. – Golden, Colorado. – 1998 – 328 p.
19. *Кейтс М.* Техника липидологии / М. Кейтс; [пер. с англ.] – М. : Мир, 1975. – 324 с.
20. *Hammond E.W.* Chromatography for the analysis of lipids/ E.W. Hammond. – Boca Raton, USA.: CRC Press, 2000. ISBN 0-8493-4255-4
21. *Reddy M.H.* Application of algal culture technology for carbon dioxide and flue gas emission control : A thesis for partial fulfilment of the requirements for the degree Master of Science / Madhu Hanumantha Reddy ; Arizona State University. – Phoenix, 2002. – 96 p.
22. *Трифонов В.Ю.* Использование дымовых газов, образующихся в процессе термической переработки твердых бытовых отходов, для выращивания микроводоросли *Spirulina platensis* / В.Ю. Трифонов // Экологический вестник России. – 2009. – №9. – С. 28-32.
23. *Garcia M.* Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profil / M. Garcia , J. Sevilla, F. Fernandez, E. Grima, F. Camacho. - Journal of Applied Phycology. – 2000. – Vol. 12. – pp. 239 – 248.
24. *Yousuf A.* Microalgae Cultivation for Biofuels Production 1st Edition / Abu Yousuf // Elsevier. Academic Press. – 2019.– 382 p.
25. *Pandey A.* Biofuels from Algae / Ashok Pandey, Duu-Jong Lee // Elsevier. Academic Press. – 2014. – 348 p.

26. *Se-Kwon Kim*. Handbook of Marine Microalgae / Se-Kwon Kim // Biotechnology Advances. – 2015. – 604 p.
27. *Guckert J.B.* Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (*Chlorophyta*) during high pH-induced cell cycle inhibition / J.B. Guckert, K.E. Cooksey // J. Phycol. – 1990. – Vol. 26. – p. 72-79.